

**Inserm**

**mio**  
Mediterranean Institute of Oceanography

## Principes généraux de la cytométrie en flux

**Gérald GREGORI (Ph.D, Chargé de recherche)**  
Mediterranean Institute of oceanography (M.I.O)  
CNRS/IRD, Aix Marseille University, Toulon University  
Case 901, Campus de Luminy, Bâtiment OCEANOMED  
13288 Marseille cedex 9, France

<https://precym.mio.univ-amu.fr/>

**-PRECYM**

Observatoire des Sciences de l'Univers  
**INSTITUT D'ASTROGÉO**

---

---

---

---

---

---

---

---

**CRIS** **mio**

## Définition de cytométrie en flux

Mesure (-métrie) des propriétés optiques de cellules (cyto-) transportées par un liquide vecteur (flux) jusqu'à une source d'excitation lumineuse (souvent un laser).

↓

- Lumière (laser ou lampe à arc) diffusée par les particules (cellules)
- Fluorescence(s) naturelle(s) ou induite(s) émise par les particules (cellules)
- Flux de particules monodisperse
- Analyse multivariée des particules (cellules)
- Mise en évidence de sous-populations

---

---

---

---

---

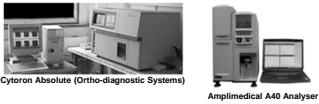

---

---

---

**CRIS** **mio**

## Deux familles d'instruments

- **Cytomètre en flux analyseur**  

⇒ Analyses des cellules
- **Cytomètre en flux analyseur-trieur**  

⇒ Analyse des cellules  
+  
Tri (séparation physique)

---

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

- Distributeurs de cytomètres en flux**
- Advanced Analytical Technologies, Inc. (USA)
  - Agilent Technologies (USA)
  - Apogee Flow Systems (UK)
  - BD Biosciences (USA)
  - Beckman Coulter (USA)
  - BioDETECT AS (Norway)
  - Bentley Instruments (USA)
  - Chemunex SA (France)
  - CytoBuoy b.v (Netherlands)
  - Cytopenia (USA)
  - DakoCytomation (USA)
  - Delta Instruments bv (Netherlands)
  - Fluid Imaging Technologies, Inc. (USA)
  - FOSS Electric A/S (Denmark)
  - Guava Technologies, Inc. (USA)
  - Howard M. Shapiro, M.D., P.C. (USA)
  - iCyt- Visionary Bioscience (USA)
  - International Remote Imaging Systems (USA)
  - Luminex Corporation (USA)
  - NPE Systems, Inc. (USA)
  - One Lambda, Inc. (USA)
  - Partec GmbH (Germany)
  - Union Biometrica, Inc. (USA)
- D'après Practical Flow Cytometry 4<sup>th</sup> Edition (H. Shapiro)

---

---

---

---

---

---

---

---

**Les composants d'un cytomètre**

**Fluidique** : Séparation et alignement des particules, tri, vitesse d'analyse et de tri;

**Optique** : Source(s) lumineuses, détecteurs, séparation spectrale (filtres, miroirs dichroïques);

**Electronique** : Collection et analyse des signaux optiques; affichage des données; contrôle des sources lumineuses, des détecteurs et du tri;

**Analyse des données** : affichage et analyse des données; analyses multivariées; identification de sous-populations; quantification.

---

---

---

---

---

---

---

---

**La composante fluïdique**

- Echantillon = Cellules en suspension liquide
- Liquide vecteur (liquide de gaine) :
  - Eau distillée ou solution saline (PBS; eau de mer filtrée) pour analyse
  - Solution saline pour tri
- Echantillon et liquide de gaine injectés dans le cytomètre
  - Par seringues
  - Par un système pressurisé
- Pas de mélange entre liquide de gaine et échantillon (écoulement laminaire)

---

---

---

---

---

---

---

---

**Principe de focalisation hydrodynamique par un liquide vecteur (liquide de gaine)**

- Séparation
- Alignement des particules

---

---

---

---

---

---

---

---

**Principe de focalisation hydrodynamique**

[http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro\\_Flow/player.html](http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html)

---

---

---

---

---

---

---

---

Exemple de focalisation hydrodynamique

Liquide de gaine

Focalisation hydrodynamique

---

---

---

---

---

---

---

---

Le principe du liquide de gaine (P.J. Crossland-Taylor)

"Provided there is no turbulence, the wide column of particles will then be accelerated to form a narrow column surrounded by fluid of the same refractive index which in turn is enclosed in a tube which will not interfere with observation of its axial content."

A Device for Counting Small Particles Suspended in a Fluid through a Tube  
P.J. Crossland-Taylor  
Bland-Sutton Institute of Pathology  
Middlesex Hospital, London, W.1. June 17, 1952  
Nature 171: 37-38, 1953

---

---

---

---

---

---

---

---

Principaux types de chambres de flux

- **Jet dans l'air (jet-in-air)**
  - Optimum pour le tri ,
  - propriétés optiques inférieures
- **Flux à travers une cuvette**
  - propriétés optiques excellentes,
  - peut servir au tri
- **Flux en biais fermé**
  - propriétés optiques optimales,
  - tri impossible
- **Flux ouvert à travers une surface**
  - propriétés optiques optimales,
  - tri impossible

---

---

---

---

---

---

---

---

**En pratique**

Echantillon  
Liquide de gaine  
Point d'interrogation  
Jet (échantillon + liquide de gaine)

Adapté de DakoCytomation

---

---

---

---

---

---

---

---

**Optique – Les sources de lumière**

**Lampes à arc (ex : lampe à mercure)**

- Fournissent un mélange de longueurs d'onde qui doit être **filtré** pour sélectionner les longueurs d'onde désirées
- Fournissent une lumière de quelques milliwatts
- Sont peu onéreuses (refroidies par air)
- Fournissent une lumière **incohérente**

Figure 1

---

---

---

---

---

---

---

---

**Source d'excitation (I) : Lampe à arc**

H.B. Steen - MLM Chapt. 2

---

---

---

---

---

---

---

---

**Optique – Les sources de lumière (II)**

**Lasers**

- Faisceau d'une seule longueur d'onde (**raie laser**) ou (plus rarement) un mélange de raies
  - Ils peuvent fournir des raies de quelques milliwatts à plusieurs watts
  - Ils peuvent être peu onéreux (lasers refroidis par air) ou très onéreux (lasers refroidis par eau)
  - Ils fournissent une lumière **cohérente**

Argon (Ar) (352 et 488 nm)  
 Krypton (Kr) (red lines)  
 Helium Neon (He-Ne) (633 nm)  
 Helium Cadmium (He-Cd) (325 et 441 nm)  
 YAG (525 nm)  
 Violet (405 nm)  
 Lasers solides

---

---

---

---

---

---

---

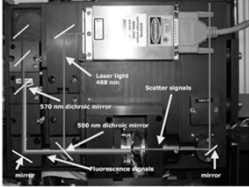
---

---

---


**Exemple de cytomètre en flux utilisant**

**1 laser**



Amplimedical A40 Analyser

**3 lasers**



MoFlo (ex-Dako, Beckman Coulter)

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**Optique – Canaux Optiques**

- Un **canal optique** est un chemin que la lumière peut suivre depuis le point d'interrogation (particule) jusqu'à un **détecteur**
- Des éléments optiques (**filtres et miroirs dichroïques**) réalisent la séparation des canaux et la sélection des longueurs d'onde

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**Lumière diffusée aux petits angles**

Intensité = fonction de la taille des particules (cellules)

Adapté de Purdue University Cytometry Laboratories

---

---

---

---

---

---

---

---

**Diffusion à 90 degrés**

Intensité = fonction de la forme, de la structure interne et de la granularité des particules (cellules)

Adapté de Purdue University Cytometry Laboratories

---

---

---

---

---

---

---

---

**Optique – Canaux de fluorescence**

- La fluorescence est une lumière produite par les particules sous l'effet de l'excitation lumineuse
- Chaque fluorochrome est habituellement détectée dans un **canal unique de fluorescence (couleur)**
- La spécificité de la détection est contrôlée par la sélectivité vis à vis des longueurs d'onde des filtres optiques et des miroirs dichroïques.

---

---

---

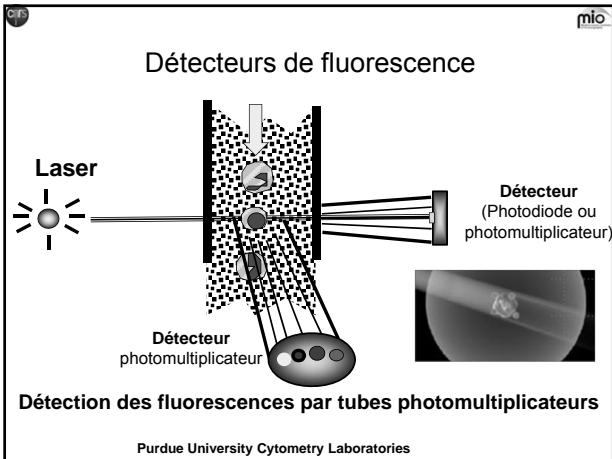
---

---

---

---

---




---

---

---

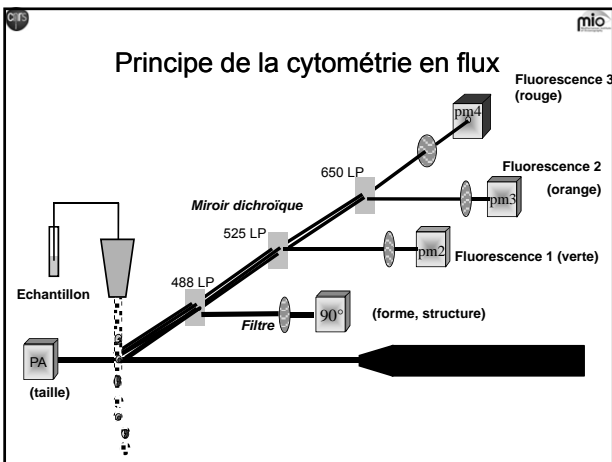
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

**Optique – Séparation des canaux**

- Utilisation de filtres et de miroirs dichroïques

- Filtres optiques = matériaux qui absorbent certaines longueurs d'onde et transmettent les autres
- Les transitions entre absorption et transmission ne sont pas parfaites (spécification lors de la réalisation du filtre)

---

---

---

---

---

---

---

---

**Filtre passe-haut standard**

Filtre passe-haut 620 nm

Source de lumière blanche      Lumière transmise

Lumière > 620 nm

**Filtre passe-bas standard**

Filtre passe-bas 525 nm

Source de lumière blanche      Lumière transmise

Lumière < 525 nm

Purdue University Cytometry Laboratories

---

---

---

---

---

---

---

---

**Filtre passe-bande standard**

Filtre passe-bande 630 nm

Source de lumière blanche      Lumière transmise

Lumière 620 - 640 nm

Purdue University Cytometry Laboratories

---

---

---

---

---

---

---

---

**Optique – Propriétés des filtres**

- Quand un filtre fait un angle de 45° avec la lumière incidente, la lumière que ce filtre peut transmettre sous incidence normale est encore transmise, mais la lumière qui aurait été bloquée est réfléchie (suivant un angle de 90° par rapport à la direction d'incidence)
- Dans ces conditions, le filtre est appelé **filtre** ou **miroir dichroïque**

---

---

---

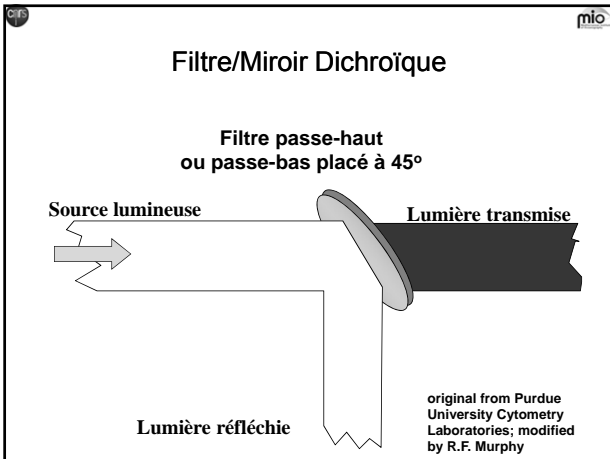
---

---

---

---

---




---

---

---

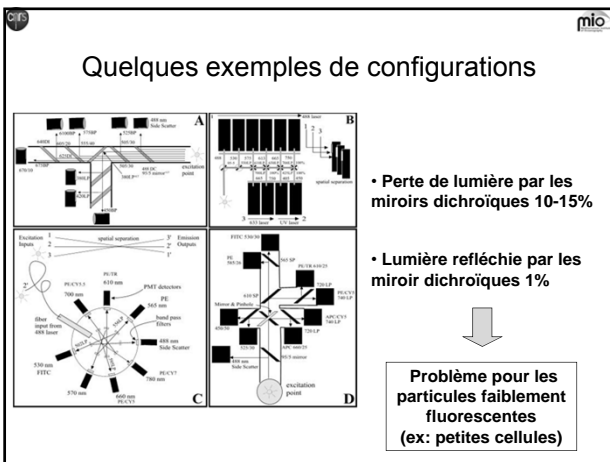
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

**Optique – Les détecteurs de photons (I)**

- La quantité de lumière (nombre de photons) diffusée ou émise par fluorescence par les particules (cellules) doit être convertie en voltage pour être mesuré;
- Ce voltage est ensuite converti en valeur digitale enregistrable (sur ordinateur);
- Le choix du détecteur dépend du nombre de photons à mesurer.

---

---

---

---

---

---

---

---

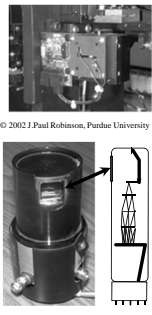
**Optique - Les détecteurs de photons (II)**

➤ **Photodiode**  
 - Pour signaux très intense, lorsque la saturation du détecteur constitue un problème potentiel (pas de gain)  
 (i.e., détecteur pour la diffusion aux petits angles)

➤ **Tube photomultiplicateur**  
 - Plus sensible qu'une photodiode (gain important →  $10^6$ )  
 (i.e., détecteur de fluorescence)

Rq : peut être détruit si exposé à une lumière trop intense

➤ **Autres types**  
 (capteurs CCD, avalanche photodiodes)



© 2002 J. Paul Robinson, Purdue University

---

---

---

---

---

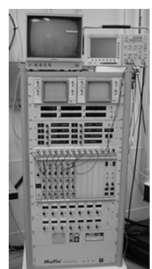
---

---

---

**Electronique**

- Contrôle des détecteurs (voltage, gain)
- Traitement des signaux à partir des détecteurs
  - Génération d'intégrale ou de largeur d'impulsion
  - Fenêtres de détection (déclenchement, seuil)
  - Synchronisation
    - Nécessaire pour les acquisitions multiparamétriques
  - Paramétrage du tri
  - Conversion Analogique-Digital




---

---

---

---

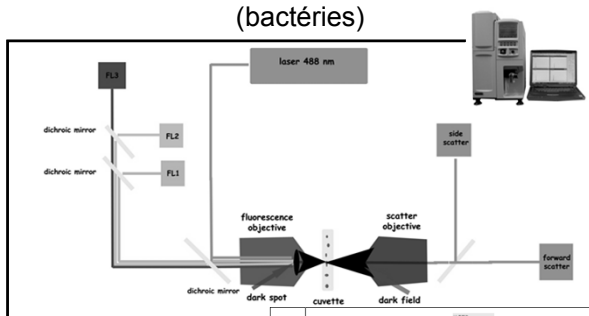
---

---

---

---

**Epi-illumination et fond noir :  
 Meilleure résolution des petites cellules (bactéries)**



Amplimedical 40 Analyser

---

---

---

---

---

---

---

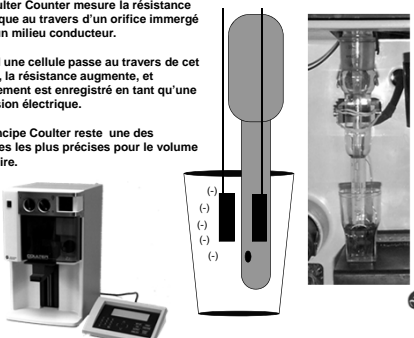
---

**Mesure du volume des particules**

Le Coulter Counter mesure la résistance électrique au travers d'un orifice immergé dans un milieu conducteur.

Quand une cellule passe au travers de cet orifice, la résistance augmente, et l'événement est enregistré en tant qu'une impulsion électrique.

Le principe Coulter reste une des mesures les plus précises pour le volume cellulaire.



**BIOCHAM COUNTER**

---

---

---

---

---

---

---

---

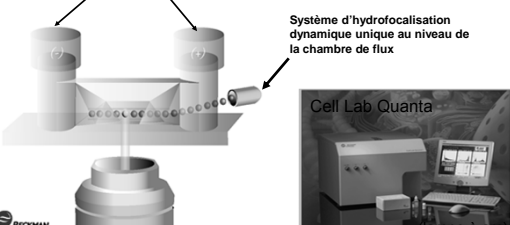
---

---

**Mesure du volume cellulaire par cytométrie en flux**

Des électrodes sur les deux côtés de la chambre de flux permettent d'établir un courant électrique, qui, quand il sera modifié par le passage de cellules, comptera les cellules et mesurera leur volume.

Système d'hydrofocalisation dynamique unique au niveau de la chambre de flux



**Cell Lab Quanta**

**BIOCHAM COUNTER**

---

---

---

---

---

---


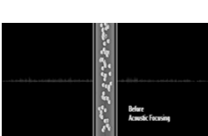
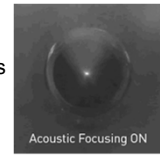
---

---

---

---

**Cytomètre à alignement acoustique ATTUNE Nxt**

- Focalisation acoustique utilise des radiations ultrasoniques (>2 MHz) pour déplacer les particules au centre du jet.
- Analyse rapide : 12.5–1,000 µL/min
- Jusqu'à 35 000 particules/s

**Acoustic Focusing ON**

<https://www.thermofisher.com/>

---

---

---

---

---

---


---

---



---

---

**Cytoflex : Des APD au lieu des PMTs**



- Proprietary Axial Light Loss (ALL) sensor system using silicon photodiodes with built in 488/8 nm band pass filter.
- Fluorescence and side scatter light delivered by fiber optics to Avalanche Photo Diode detector arrays.
- Wavelength Division Multiplexing (WDM) detection module
- 10 to 240  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; 30 000 EPS

<http://www.beckman.fr/>

---

---

---

---

---

---

---

---


---

---

**Cytometry by Time of Flight (CyTOF®)**  
(CyTOF, DVS Science, Canada)

Le "CyTOF® mass cytometry" utilise des métaux rares comme marqueurs d'anticorps, plutôt que des fluorophores comme ceux appliqués en cytométrie en flux.

Le CyTOF® permet d'analyser plus de 30 paramètres différents sur une même cellule sans se soucier des chevauchements spectraux. Cela permet de collecter plus efficacement de nombreuses variables, en utilisant peu d'échantillon.




---

---

---

---

---

---

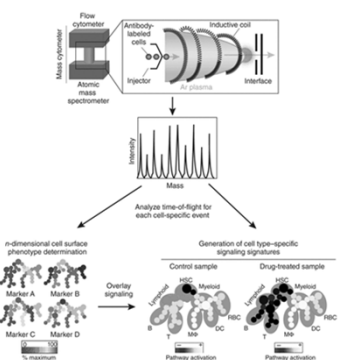
---

---

---

---

**Cytometry by Time of Flight (CyTOF®)**



Nature biotechnology (2011), 29 (7), 602

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



**Cytométrie automatisée à haute fréquence**

*in situ flow cytometry*  
 → Fluorescence and light scatter recorded along each particle (cell)

**Laser**

**Optical fingerprints**

Courtesy of Thyssen M., MIO

---

---

---

---

---

---

---

---

**Installation « in situ »**

---

---

---

---

---

---

---

---

**Image-in-flow : Visualisation des cellules**

**PARAMETERIZING**  
 The pulse profiles are parameterized by a set of eight parameters for each channel. These contain 2 absolute entities and 6 entities characterizing the profile shape.

- Peak height
- Average height
- Maximum amplitude
- Average signal
- FWHM
- Asymmetry
- Skewness
- Number of "peaks"

---

---

---

---

---

---

---

---

## Acquisition des données

### Groupes cytométriques (ataxonomiques)

Abondances, fluorescence diffusion par cellule:  
→ Contenu en Chl.a, phycoérythrine, taille, conversion en biomasse

### Images (taxonomique)

Photos des cellules constituant les groupes d'intérêt (taille cell. > 20µm)

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## A quoi ressemblent les données?

- Chaque mesure issue de chaque détecteur est désignée sous le nom de « paramètre »
- Les données sont enregistrées sous forme de "liste" de valeurs pour chaque "paramètre" (variable), pour chaque "évènement" (cellule)

**Variables mesurées**  
(DPA, D90°, Fluorescences)

1 <sup>ère</sup> particule analysée →	119	779	541	797	669	507	784
2 <sup>ème</sup> particule analysée →	124	800	560	842	669	417	812
	223	817	574	837	730	480	805
	144	795	554	807	686	458	773
	134	781	551	816	675	530	800
	118	806	548	816	667	388	800
	(...)						
	117	740	522	777	656	474	745
Dernière particule analysée →	112	805	565	839	655	489	807

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Représentations des données

Mutants *E. coli*-GFP

### histogramme

### points

### densité

### contour

Resolution of multiple small species by forward and side scatter.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

cin mio

## Résumé de la présentation

<b>Fluidique</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cellules en suspension</li><li>• Flux sur une seule file à travers</li></ul>
<b>Optique</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Un volume illuminé où elles Diffusent la lumière et fluorescent</li></ul>
<b>Electronique</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Signaux collectés, filtrés et</li><li>• Convertis en valeurs numériques</li><li>• Stockées dans un ordinateur</li></ul>

---

---

---

---

---

---

---

---